

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-521789

(P2001-521789A)

(43) 公表日 平成13年11月13日 (2001. 11. 13)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 L 27/00

識別記号

F I

A 6 1 L 27/00

特コード (参考)

S 4 C 0 8 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁)

(21) 出願番号 特願2000-518711(P2000-518711)  
(86) (22) 出願日 平成10年10月30日 (1998. 10. 30)  
(85) 翻訳文提出日 平成12年5月1日 (2000. 5. 1)  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 2 2 9 6 2  
(87) 国際公開番号 W O 9 9 / 2 2 7 8 1  
(87) 国際公開日 平成11年5月14日 (1999. 5. 14)  
(31) 優先権主張番号 6 0 / 0 6 3 , 7 9 0  
(32) 優先日 平成9年10月31日 (1997. 10. 31)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 チルドレンズ メディカル センター コーポレーション  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州  
02115 ボストン ロングウッド アベニ  
ュー300

(72) 発明者 アタラ, アンソニー  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02193,  
ウエストン, ウェスラー・ロード 74

(74) 代理人 弁理士 社本 一夫 (外5名)

Fターム(参考) 4C081 AB12 AB16 CA021 CA031  
CA081 CA111 CA131 CA171  
CA191 CA201 CA211 CA231  
CA271 CA281 CD021 DB01

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膀胱再構成

(57) 【要約】

本発明は、層状に組織された管腔器官もしくは組織構造の再構築、修復、増強、または置換をそのような治療を必要とする患者において実施するための方法および装置に関する。装置は生体適合性の合成または天然ポリマーマトリクスを含有するが、これは管腔器官または組織の少なくとも一部に適合するように成型され、第一の細胞集団をポリマーマトリクスの第一の領域上もしくは領域中に、そして平滑筋細胞集団のような第二の細胞集団をポリマーマトリクスの第二の領域中に含有する。方法は、装置を治療が必要とされる患者の領域に移植することを含む。ポリマーマトリクスは生体適合性かつ生分解性である物質を含有する。C群の6検体の動物（組織調製した (tissue engineered) 新生器官を用いて再構築するもの）には、約1平方センチメートルの膀胱経腔のバイオプシーを実施したが、これは最小限の恥骨中線切開により、一般的な麻酔下で膀胱弓隆部から回収した。欠損箇所は4-0 ポリグラクチン910で創閉鎖した。膀胱標本はあらかじめ加温したケラチノサイト培地中で保存し、in vitro培養のための細胞の回収を、組織切除

の直後を開始した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 層状に組織された管腔器官もしくは組織構造の再構築、修復、増強、または置換をそれらの治療を必要とする患者において行う方法であって、以下の段階：

- a) 該治療が必要とされる管腔器官もしくは組織構造の少なくとも一部に適合するように成型された生体適合性のある合成または天然ポリマーマトリクスを提供し；
  - b) 第一の細胞集団を該ポリマーマトリクスの第一の領域上または領域中に沈着させ；
  - c) 該第一の細胞集団とは異なる細胞タイプである第二の細胞集団を該ポリマーマトリクスの第二の領域に沈着させるが、該第二の領域は該第一の領域から実質的に分離しており；そして、
  - d) 成型されたポリマーマトリクス細胞構築物を該患者に該治療部位でインプラントして層状に組織された管腔器官または組織構造を形成する、
- を含んでなる上記方法。

【請求項2】 生体適合性物質が生分解性である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 生体適合性ポリマーマトリクスがセルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ素化ポリエチレン、フェノール類 (phenolic)、ポリ-4-メチルペンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリレート、ポリベンズオキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリールエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフルオライド、再生セルロース、シリコーン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーもしくは物理的混合物からなる物質の群から選択される物質から形成される、請求項1記載の方法

【請求項4】 生体適合性物質がポリグリコール酸である、請求項1記載の方法。

【請求項5】 ポリマーマトリクスが繊維間の距離が約0から1000 $\mu$ mである繊維を含有する、請求項1記載の方法。

【請求項6】 ポリマーマトリクスが繊維間の距離が約0から500 $\mu$ mである繊維を含有する、請求項1記載の方法。

【請求項7】 ポリマーマトリクスが繊維間の距離が約0から200 $\mu$ mである繊維を含有する、請求項1記載の方法。

【請求項8】 ポリマーマトリクスが生体適合性かつ生分解性の成型された硬化 (setting) 物質で被覆される、請求項1記載の方法。

【請求項9】 成型硬化物質が液体コポリマーを含有する、請求項8記載の方法。

【請求項10】 コポリマーがポリ-DL-ラクチド-コグリコリドを含有する、請求項9記載の方法。

【請求項11】 第一の細胞集団が実質的に尿路上皮細胞集団である、請求項1記載の方法。

【請求項12】 第二の細胞集団が実質的に平滑筋細胞集団である、請求項1記載の方法。

【請求項13】 管腔器官または組織構造が尿生殖器のものである、請求項1記載の方法。

【請求項14】 管腔器官または組織構造が膀胱 (bladder)、尿管 (ureters)、および尿道 (urethra) からなる群から選択される、請求項13記載の方法。

【請求項15】 管腔器官または組織構造が膀胱または膀胱部分であり、該マトリクスの内表面上に沈着した尿路上皮細胞および該マトリクスの外表面上に沈着した平滑筋細胞を有する、請求項14記載の方法。

【請求項16】 in vivoで形成された層状に組織された管腔器官または組織構造が天然の膀胱組織のコンプライアンスを示す、請求項15記載の方法。

【請求項 1 7】 該第一および第二の細胞集団を連続的に沈着させる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 8】 該第一および第二の細胞集団を独立したマトリクス層に沈着させ、該マトリクス層を沈着段階後に結合する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 9】 層状に組織された管腔器官もしくは組織構造の再構築、修復、増強、または置換のための装置であり、以下：

インプラント可能な、生体適合性のある、合成または天然のポリマーマトリクスであって、少なくとも 2 つの独立した表面を有し、該治療が必要とされる管腔器官または組織構造の少なくとも一部に適合するように成型されたもの、および、該ポリマーマトリクス上または該ポリマーマトリクス中の実質的に独立した領域に沈着して、層状に組織されたマトリクス／細胞構築物を形成する、少なくとも 2 つの異なる細胞集団、  
を含んでなる上記装置。

【請求項 2 0】 生体適合性物質が生分解性である、請求項 1 9 記載の装置

。

【請求項 2 1】 生体適合性ポリマーマトリクスがセルロースエーテル、セルロース、セルロースエステル、フッ素化ポリエチレン、フェノール類 (phenolic)、ポリ-4-メチルペンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリレート、ポリベンズオキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリールエーテル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリビニリデンフルオライド、再生セルロース、シリコーン、尿素-ホルムアルデヒド、またはそれらのコポリマーもしくは物理的混合物からなる物質の群から選択される物質から形成される、請求項 1 9 記載の装置。

【請求項 2 2】 生体適合性物質がポリグリコール酸である、請求項 1 9 記載の装置。

【請求項 2 3】 ポリマーマトリクスが繊維間の距離が約 0 から 1 0 0 0  $\mu$ m である繊維を含有する、請求項 1 9 記載の装置。

【請求項 2 4】 ポリマーマトリクスが繊維間の距離が約 0 から 5 0 0  $\mu$ m である繊維を含有する、請求項 1 9 記載の装置。

【請求項 2 5】 ポリマーマトリクスが繊維間の距離が約 0 から 2 0 0  $\mu$ m である繊維を含有する、請求項 1 9 記載の装置。

【請求項 2 6】 ポリマーマトリクスが生体適合性かつ生分解性の成型された硬化物質で被覆された、請求項 1 9 記載の装置。

【請求項 2 7】 成型硬化物質が液体コポリマーを含有する、請求項 2 6 記載の装置。

【請求項 2 8】 コポリマーがポリ-DL-ラクチド-コ-グリコリドを含有する、請求項 2 7 記載の装置。

【請求項 2 9】 第一の細胞集団が実質的に尿路上皮細胞集団である、請求項 1 9 記載の装置。

【請求項 3 0】 第二の細胞集団が実質的に平滑筋細胞集団である、請求項 1 9 記載の装置。

【請求項 3 1】 管腔器官または組織構造が尿生殖器のものである、請求項 1 9 記載の装置。

【請求項 3 2】 管腔器官または組織構造が膀胱 (bladder)、尿管 (ureters)、および尿道 (urethra) からなる群から選択される、請求項 3 1 記載の装置。

【請求項 3 3】 管腔器官または組織構造が膀胱または膀胱部分であり、該マトリクスの内表面上に沈着した尿路上皮細胞および該マトリクスの外表面上に沈着した平滑筋細胞を有する、請求項 3 2 記載の装置。

【請求項 3 4】 *in vivo*で形成された層状に組織された管腔器官または組織構造が天然の膀胱組織のコンプライアンスを示す、請求項 3 3 記載の装置。

【請求項 3 5】 該第一および第二の細胞集団を連続的に沈着させる、請求

項19記載の装置。

【請求項36】 該第一および第二の細胞集団を独立したマトリクス層に沈着させ、該マトリクス層を沈着段階後に結合する、請求項19記載の装置。

【請求項37】 損傷もしくは喪失した膀胱組織の修復、再構築、増強、または置換を、そのような治療が必要な患者において行うための装置であり、以下：

インプラント可能な、生体適合性のある、合成または天然のポリマーマトリクスであって、該治療が必要とされる該膀胱組織の部分に適合するように成型され、該マトリクスの内部表面上および内部表面付近に沈着した尿路上皮細胞を有し、そして該マトリクスの外部表面上および外部表面付近に沈着した平滑筋細胞を有するものであり、該患者への移植に際して該装置が正常な膀胱組織のコンプライアンスを有する層状に組織された管腔組織構造を形成するもの、  
を含んでなる上記装置。

【請求項38】 該成型されたマトリクスがポリグリコール酸、ポリ乳酸、およびそれらのコポリマーまたは混合物からなる群から選択されるポリマーの繊維状メッシュであり、形状保持物質で被覆される、請求項37記載の装置。

【請求項39】 該形状保持物質が硬化可能なポリマーである、請求項37記載の装置。

【請求項40】 該硬化可能なポリマーがポリ-DL-ラクチド-コ-グリコリドである、請求項39記載の装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

背景1. 発明の分野

本発明は組織再建、修復増大および置換のための方法および素材に、そして特に膀胱など尿生殖組織の損傷を有する患者における治療の使用に向けられる。

2. 背景の説明

医学界は、手術的に有効な置換での、不完全な器官の交換にかなりの注目および努力を向けてきた。置換は、人工心臓などの完全に合成された装置から、別の哺乳動物ドナー由来の完全に天然の器官に渡る。心臓移植の分野は、合成心臓および生存ドナーからの天然心臓両方の使用で、特に成功してきた。多くの他の器官の分野、特に膀胱再建の分野では同様の成功が達成されていない。

## 【0002】

ヒトの膀胱は、筋結膜嚢であり、骨盤腔の前部に位置し、尿の貯蔵庫として作用する。膀胱は尿管を通じ尿を受け取り、そして尿道を通じ放出する。ヒトでは、膀胱は骨盤中、骨盤の骨（恥骨結合）の後ろにあり、そして尿道と呼ばれる排出管が体の外部に出る。膀胱、尿管、および尿道はすべて、尿の通常可溶性物質に対して不透過性である粘液で覆われた尿路上皮（urothelial）細胞を含む膜で裏打ちされている筋肉構造を含むよう、同様の構造を与えられている。膀胱三角（trigone of the bladder, trigonum vesicae）は、膀胱基部の粘膜の滑らかな三角形部分である。膀胱組織は伸縮性でありそして従順（compliant）である。すなわち、膀胱は、含む尿の量にしたがい、形状および大きさを変える。膀胱は、空のとき、しぼんだ風船に似ているが、尿の量が増加すると、幾分なし型になり、そして腹腔内へ上昇する。

## 【0003】

膀胱壁は組織の3つの主要な層を有する：粘膜、粘膜下組織、および排尿筋である。粘膜は、尿路上皮細胞を含み、最も内側の層であり、そして遷移性細胞上皮からなる。粘膜下組織は、粘膜およびその基底膜の直下にある。該組織は、粘

膜に栄養物を供給する血管、および老廃物の除去を促進するリンパ節からなる。排尿筋は、膨張して尿を貯蔵し、そして収縮して尿を放出する平滑筋細胞の層である。

#### 【0004】

膀胱は、患者において劣化 (deterioration) を引き起こす多くの病気および損傷にさらされる。例えば、膀胱劣化は、感染症、新生物および発達異常から生じる可能性がある。さらに膀胱劣化は、例えば自動車事故およびスポーツでの損傷などの外傷の結果として発生する可能性もある。

#### 【0005】

合成および天然由来ポリマーを含む、数多くのバイオマテリアルが、組織再建または増大に使用されてきている (例えば "Textbook of Tissue Engineering", Lanza, R., Langer, R., および Chick, W. 監修, ACM Press, コロラド (1996) および該文献に引用される参考文献を参照されたい) が、膀胱再建の使用に十分であると立証された素材はなかった。例えば合成バイオマテリアル、例えばポリビニルおよびゼラチンスポンジ、ポリテトラフルオロエチレン (テフロン) フェルト並びにシリラスティック (silastic) パッチは、概して異物反応のため、比較的不成功であった (例えば, Kudish, H. G., J. Urol. 78:232 (1957); Ashkar, L. および Heller, E., J. Urol. 98:91 (1967); Kelami, A. ら, J. Urol. 104:693 (1970) を参照されたい)。他の試みは、機械的、構造的、機能的、または生体適合性いずれかの問題のため、通例失敗した。永続的合成素材は、機械的不全および結石形成と関連付けられてきている。

#### 【0006】

天然由来素材、例えば凍結乾燥硬膜、脱上皮化腸部分、および小腸粘膜下組織 (SIS) もまた、膀胱置換に提案されてきている (一般的な概説には、"Textbook of Tissue Engineering", Lanza, R., Langer, R., および Chick, W. 監修, ACM P



ress, コロラド (1996) 中のMooney, D. ら, "Tissue Engineering: Urogenital System" を参照されたい)。しかし、硬膜、腹膜、胎盤および筋膜で増大した膀胱は、一定期間に渡り収縮すると報告されてきている (Kelami, A. ら, J. Urol. 105:518 (1971))。脱上皮化腸部分は、膀胱再建の使用に適した尿路上皮性被覆であることを示したが、粘膜再成長、該部分の線維症のいずれか、または両方の障害が残る。腸部分の脱上皮化は、粘膜再成長につながる可能性がある一方、粘膜および粘膜下組織の除去は腸部分の退縮 (retraction) につながる可能性があることが示されてきている (例えば, Atala, A., J. Urol. 156:338 (1996) を参照されたい)。

#### 【0007】

膀胱手術に関する特定の胃腸部分の使用には、結石形成、粘液産生増加、新形成、感染、代謝妨害、長期攣縮および再吸収を含む、他の問題が報告されてきている。天然または合成素材でのこれらの試みは、特定の筋収縮特性および尿路上皮透過性機能を持つ膀胱組織は、容易に置換できないことを示してきている。

#### 【0008】

膀胱再建に対する胃腸部分の使用に関連する多数の障害のため、研究者は別の解決を探している。近年の外科的アプローチは、自己増大および尿管膀胱形成術を含め、再建のための天然泌尿器組織に頼ってきている。しかし、自己増大の長期結果は期待はずれであり、そして尿管膀胱形成術は、膨張した尿管がすでに存在している場合に限定される。尿管および膀胱の進行性膨張の系が提案されてきているが、これはまだ臨床的に試みられていない。漿液筋肉 (sero-muscular) 移植片および脱上皮化腸部分もまた、単独でまたは天然尿路上皮の上で、試みられてきている。しかし、移植片縮小および最初は脱上皮化されている腸部分の再上皮化が繰り返される問題となってきた。

#### 【0009】

膀胱再建を阻む1つの重大な制限は、ドナー組織の入手可能性に直接関連する。膀胱組織入手可能性が制限されているため、正常膀胱組織を用いた頻繁な日常

的膀胱再建が妨げられる。入手可能であり、そして使用可能と見なされる膀胱組織は、それ自体、生得的な不備および疾患を含む可能性がある。例えば、膀胱癌を患う患者に残存する膀胱組織は転移で汚染されている可能性がある。したがって、該患者は膀胱機能が完全以下であることが前もって決まっている。

#### 発明の概要

本発明は、管腔器官および組織構造の増大および置換の再建修復のための現戦略に関連する問題および不都合な点を克服する。

#### 【0010】

本発明の1つの態様は、こうした治療が必要な患者における、薄層状に組織されている管腔器官または組織構造の再建、修復、増大または置換のための方法に向けられる。該方法は、前記治療が必要な管腔器官または組織構造の少なくとも一部と一致するよう成形されている生体適合性合成または天然ポリマー性マトリックスを提供し、第一の細胞集団を前記ポリマー性マトリックスの第一の領域上または該領域内に置き、前記の第一の細胞集団とは異なる細胞種の第二の細胞集団を該ポリマー性マトリックスの第二の領域に置くことを含む。第二の領域は、第一の領域から実質的に分離されている。成形ポリマー性マトリックス細胞構築物を、患者の治療が必要な部位に移植し、薄層状に組織されている管腔器官または組織構造を形成する。

#### 【0011】

本発明の別の態様は、薄層状に組織されている管腔器官または組織構造の再建、修復、増大または置換のための装置に向けられる。該装置は、少なくとも2つの分離した表面を持つ、移植可能な生体適合性合成または天然ポリマー性マトリックスを含む。該ポリマー性マトリックスは、前記治療が必要な管腔器官または組織構造の少なくとも一部と一致するよう成形されており、そして少なくとも2つの異なる細胞集団が、該ポリマー性マトリックス上または該マトリックス内の実質的に分離した領域に置かれており、薄層状に組織されているマトリックス／細胞構築物を形成する。

#### 【0012】

本発明のさらなる態様は、こうした治療が必要な患者における、損傷を受けた

または失われた膀胱組織の修復、再建、増大または置換のための装置に向けられる。該装置は、移植可能な生体適合性合成または天然ポリマー性マトリックスであって、治療が必要な膀胱組織の一部と一致するよう成形されている前記マトリックスを含む。尿路上皮細胞は、マトリックスの内部表面上およびその近傍に置かれ、そして平滑筋細胞は、前記マトリックスの外部表面上およびその近傍に置かれる。患者に移植されると、該装置は正常膀胱組織の従順さを持つ、薄層状に組織されている管腔組織構造を形成する。

#### 【0013】

本発明の他の態様および利点は、部分的に以下の説明に、そして部分的に本説明から明白であろうし、そして本発明の実施から学び取ることが可能である。

#### 発明の説明

本発明は、組織再建を容易にする方法および装置を提供する。その最も広い形式で、本発明の方法および装置は、多層細胞組織を含む器官または組織構造、および特に天然で管腔である器官または組織構造の再建、修復、増大または置換に有用である。より詳細には、本発明は、異なる細胞種の薄層状分離 (segregation) を示し、そして一般的な管腔形状を保持する必要がある中空の形状の器官または組織構造の再建、修復、増大または置換を容易にする方法および装置を提供する。従順なまたは収縮可能な特性を器官または構造に与える平滑筋細胞 (SMC) 層を含む管腔器官または組織構造は、本発明の方法および装置に特によく適している。

#### 【0014】

本発明の1つの好ましい態様の例において、管腔器官は、尿路上皮細胞を含む第一の細胞集団の内部層、および平滑筋細胞を含む第二の細胞集団の外部層を有する膀胱である。本編成は、尿管および尿道などの他の尿生殖器官および組織構造にも存在している。薄層状に組織されている器官または組織は、管組織を含め、薄層からなるまたは薄層に配置されているいかなる器官または組織も指す。本発明が向けられる、薄層状に組織されている他の適した管腔器官、組織構造、または管組織には、精管、ファローピウス管、涙小管、気管、胃、腸、血管系、胆管、射精管、精巣上体管、耳下管、および外科生成シャントが含まれる。

## 【0015】

本発明の方法は、その最も広い側面において、第一の段階として、修復され、再建され、増大されまたは置換されるべき管腔器官または組織構造の一部またはすべてとしてのその使用に一致するよう成形されている生体適合性合成または天然ポリマー性マトリックスを提供することを含む。生体適合性素材は、生物学的機能に対し毒性のまたは傷害性の影響を持たない、いかなる物質であってもよい。成形マトリックスは、好ましくは、マトリックスの孔上および孔内両方に細胞を置くことが可能であるように、多孔性である。成形ポリマー性マトリックスをその後、好ましくは続いて、マトリックスの分離した領域（例えば、内部および外部）に供給される少なくとも2つの異なる細胞集団と接触させ、細胞集団をマトリックス上および／またはマトリックス内部に植え付ける（seed）。植え付けたマトリックスをその後、レシピエントの体内、分離した薄層状に組織されている細胞集団が改良器官（neo-organ）または組織構造の形成を容易にする場所に移植する。

## 【0016】

好ましい態様において、本発明の素材および方法は、膀胱組織の再建または増大に有用である。したがって、本発明は、膀胱外反、膀胱容量不足、部分的または全膀胱切除に続く膀胱再建、外傷により損傷を受けた膀胱の修復、およびそれらに匹敵するものなどの状態に対する治療を提供する。

## 【0017】

本明細書において、本発明にしたがった膀胱増大に対する言及を行うが、本発明の方法および素材は、患者の多様な組織および器官の組織再建または増大に有用であることが理解されるであろう。したがって、例えば、膀胱、尿管、尿道、腎盂などの器官または組織、およびそれらに匹敵するものを、細胞を植え付けたポリマー性マトリックスで増大させまたは修復してもよい。本発明の素材および方法は、さらに、血管組織（例えば、Zdrachala, R. J., J Biomater. Appl. 10 (4) : 309-29 (1996) を参照されたい）、腸組織、胃（例えば、Laurencin, C. T. ら, J Biomed Mater. Res. 30 (2) : 133-8 1996）

、およびそれらに匹敵するものの再建または増大に適用してもよい。治療されるべき患者は、組織の再建、修復、または増大が必要な、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、またはヒトなどのいかなる種であってもよい。

#### ポリマー性マトリックス

生体適合性素材および特に生物分解性素材は、ポリマー性マトリックスの構築に好ましい素材である。ポリマー性素材は、再建尿路上皮移植片 (RUG) の構築に用いられる。RUGは、少なくとも2つの分離した表面を持つ、移植可能な生体適合性合成または天然ポリマー性マトリックスである。RUGは治療が必要な管腔器官または組織構造の少なくとも一部に一致するよう成形されており、そして該ポリマー性マトリックス上または該マトリックス内の実質的に分離した領域に置かれる、少なくとも2つの異なる細胞集団を有する。したがって、RUGは薄層状に組織されているマトリックス/細胞構築物である。

#### 【0018】

生体適合性は、生物学的機能に対し毒性のまたは傷害性の影響を持たない素材を指す。生体分解性は、患者体内に吸収されるまたは患者体内で分解することが可能である素材を指す。生体分解性素材の例には、例えば吸収可能な縫合糸が含まれる。生体分解性構造を形成するための典型的な素材には、調節された速度で加水分解により分解し、そして再吸収される、天然または合成ポリマー、例えば、コラーゲン、ポリ (アルファエステル)、例えばポリ (乳酸)、ポリ (グリコール酸)、ポリオルトエステルおよびポリ無水物およびそれらのコポリマーが含まれる。これらの素材は、分解可能性、操作可能性、大きさおよび立体配置の最大調節を提供する。好ましい生体分解性ポリマー素材には、吸収可能合成縫合糸素材として開発されたポリグリコール酸およびポリグラクチンが含まれる。ポリグリコール酸およびポリグラクチン繊維は、製造者により供給されるように使用することが可能である。他の生体分解性素材には、セルロースエステル、セルロース、セルロース化エステル、フッ素化ポリエチレン、フェノール類、ポリ-4-メチルペンテン、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアミドイミド、ポリアクリレート、ポリベンゾオキサゾール、ポリカーボネート、ポリシアノアリルエステル、ポリエステル、ポリエステルカーボネート、ポリエーテル、ポリエ

ーテルエーテルケトン、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリフルオロオレフィン、ポリイミド、ポリオレフィン、ポリオキサジアゾール、ポリフェニレンオキシド、ポリフェニレンスルフィド、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリスルフィド、ポリスルホン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリチオエーテル、ポリトリアゾール、ポリウレタン、ポリビニル、ポリフッ化ビニリデン、再生セルロース、シリコン、尿素-ホルムアルデヒド、あるいはこれらの素材のコポリマーまたは物理的混合物が含まれる。素材は適切な抗菌剤を染み込ませてもよく、そして着色添加物により着色し、可視性を改善し、そして外科処置を援助してもよい。

#### 【0019】

現在好ましい生体適合性ポリマーは、吸収可能合成縫合糸素材として開発され、Vicryl 編吸収可能縫合糸として製造されている、グリコリドおよびラクチドの90:10コポリマーであるポリグラクチン (Ethicon Co.、ニュージャージー州ソマービル) (Craig P. H., Williams J. A., Davis K. W., ら, : A Biological Comparison of Polyglactin 910 and Polyglycolic Acid Synthetic Absorbable Sutures. Surg. 141:1010, (1975)) およびポリグリコール酸である。ポリグラクチンおよびポリグリコール酸繊維は、製造者により供給されるように使用することが可能である。生体適合性ポリマーは、例えば、溶媒キャストリング、圧モールディング、フィラメント引き伸ばし、網目作成 (meshing)、漉し出し (leaching)、織りこみ (weaving) およびコーティングなどの方法を用い、成形することが可能である。溶媒キャストリングでは、適切な溶媒、例えば塩化メチレン中の1つまたはそれ以上のポリマーの溶液を、分岐パターンレリーフ構造としてキャストリングする。溶媒を蒸発させた後、薄いフィルムが得られる。圧モールディングでは、ポリマーに1平方インチ当たり最大30,000ポンドの圧で、適切なパターンなるよう圧をかける。フィラメント引き伸ばしは、溶解したポリマーからの引き伸ばしを伴い、そして網目作成は、繊維をフェルト様物質になるよう圧をかけることによ

り網目を形成することを伴う。漉し出しでは、2つの素材を含む溶液をRUGの最終形状に近い形状に伸ばす。次に、溶媒を用いて構成要素の1つを溶かし、孔形成を生じる（本明細書に援用されるMikos、US 5, 514, 378を参照されたい）。核形成（nucleation）では、RUGの形状の薄いフィルムを放射能核分裂産物に曝露し、放射線損傷物質の跡を生成する。次に、ポリカーボネートシートに酸または塩基でエッチングし、放射線損傷物質の跡を孔に変える。最後にレーザーを用い、多くの素材を通し、個々の穴を成形しそして焼き、均一な孔サイズを持つRUG構造を形成してもよい。コーティングは、例えば液体化コポリマー（ポリ-DL-ラクチド・コグリコリド50：50、80mg/ml塩化メチレン）などの素材でポリマー構造をコーティングしまたは該素材を該構造に透過させ、その機械的特性を改変することを指す。コーティングは、望ましい機械的特性が得られるまで、1つの層または多数の層に行ってもよい。これらの成形技術は、組み合わせて使用してもよく、例えば、ポリマー性マトリックスを織りこみ、圧モールディングし、そして共に接着してもよい。さらに、異なる方法により成形した異なるポリマー性素材を、共に接合し、混成形状を形成してもよい。混成形状は、薄層状構造であってもよい。例えば、ポリマー性マトリックスを1つまたはそれ以上のポリマー性マトリックスに付着させ、多層ポリマー性マトリックス構造を形成してもよい。付着は、液体ポリマーで接着することによって、または縫合することによって行ってもよい。さらに、ポリマー性マトリックスを固体ブロックとして形成し、そしてレーザーまたは他の標準的機械加工技術により、望ましい最終形状に成形してもよい。レーザー成形は、レーザーを用い、素材を除去する方法を指す。

#### 【0020】

生体分解性ポリマーは、機械的特性、例えばInstron試験装置を用いた抗張性、ゲル透過クロマトグラフィー（GPC）、ガラスによる分子量、示差走査型熱量分析（DSC）による遷移温度、および赤外（IR）分光学による結合構造に関し；Amesアッセイを伴う初期スクリーニング試験およびin vitro催奇形性アッセイによる毒物学、並びに免疫原性、炎症、放出および分解研究のための動物における移植研究に関し、性質決定してもよい。in vitro

r o細胞付着および生存度は、走査型電子顕微鏡、組織学および放射性同位体を用いた定量的評価を用い、評価することが可能である。生体分解性素材はまた、該素材が患者に移植された際、分解されるのに必要な時間の量に関し、性質決定してもよい。例えば、厚さおよび網目の大きさなど、構築を変化させることにより、生体分解性素材は、約2年または約2か月の間、好ましくは約18か月および約4か月の間、より好ましくは約15か月および約8か月の間そして最も好ましくは約12か月および約10か月の間で、実質的に生体分解させることが可能である。必要であれば、生体分解性素材は、約3年、または約4年あるいは約5年またはそれ以上の間に実質的に分解しないよう構築することが可能である。

#### 【0021】

ポリマー性マトリックスは、上述のように調節された孔構造を持つよう製作することが可能である。細胞分布を決定するのに孔サイズを用いてもよい。例えば、ポリマー性マトリックス上の孔は、細胞が1つの表面から反対の表面に移動するのを可能にするほど大きくてもよい。あるいは、ポリマー性マトリックスの2つの側面の間に流体伝達はあるが、細胞は通過できないように、孔が小さくてもよい。この目的を達成するのに適した孔サイズは、直径約0.04ミクロンないし約10ミクロン、好ましくは直径約0.4ミクロンないし約4ミクロンの間である。いくつかの態様において、ポリマー性マトリックスの表面は、第一の細胞集団の孔内への付着および移動を可能にするのに十分に大きい孔を含んでもよい。孔サイズを、ポリマー性マトリックスの内部で減少させ、該ポリマー性マトリックスの1つの側面から反対の側面に細胞が移動するのを防いでもよい。ポリマー性マトリックスの反対の側面上で、孔を再び大きくし、第二の細胞集団の付着および確立を可能にしてもよい。ポリマー性マトリックス内部の孔サイズが減少しているため、第一の細胞集団および第二の細胞集団は最初は混ざることが不可能である。孔サイズが減少しているポリマー性マトリックスの1つの態様は、2つの大きな孔素材の間に挟まれている小さい孔素材の薄層状構造である。あるいは、小さい孔素材に対し薄層状にした大きな孔素材もまた、細胞のいかなる混合も伴わず、両側面上に細胞の増殖を確立することが可能である。ポリカーボネート膜は、例えば約0.01ミクロン、約0.05ミクロン、約0.1ミクロン、



約0.2ミクロン、約0.45ミクロン、約0.6ミクロン、約1.0ミクロン、約2.0ミクロンおよび約4.0ミクロンなど、非常に調節された孔サイズで製作することが可能であるため、特に適切である。ミクロン以下のレベルでは、ポリマー性マトリックスは、細菌、ウイルスおよび他の微生物に不透過性である可能性がある。

#### 【0022】

現時点では、球形でも、波型でも、平らでも、星型でも、単独でもまたは他の繊維と絡み合っているもよい、繊維から形成されている網目様構造が好ましい。分岐繊維の使用は、体積増加に比例して表面面積が増加する問題を解決するのに自然界が使用してきているのと同じ原理に基づいている。多細胞生物はすべて、この反復分岐構造を利用している。分岐系は、器官と共に個々の器官の機能単位間の伝達ネットワークを代表する。この立体配置への細胞の植付けおよび移植は、多数の細胞の移植を可能にし、細胞は各々宿主の環境に曝露され、血管新生が達成される一方、栄養物および廃棄物の自由な交換が提供される。ポリマー性マトリックスは、望ましい最終形状、構造および機能に応じ、柔軟にまたは堅く作成してもよい。

#### 【0023】

1つの好ましい態様において、ポリマー性マトリックスは、平均繊維直径15  $\mu\text{m}$ のポリグリコール酸で形成され、そして4-0ポリグラクチン910縫合糸を用い膀胱型鋳型(mold)に設計される。生じた構造を、適当な機械特性を達成し、そしてその形状を整えるため、液体化コポリマー、例えば、ポリ-DL-ラクチド-コ-グリコリド50:50、80ミリグラム/ミリリットル塩化メチレンでコーティングする。

#### 【0024】

ポリマー性マトリックスを、例えば、移植後の新規組織形成を促進するため、移植前(所望による植付け細胞を使用する場合、ポリマー性マトリックスに細胞を植え付ける前または後)に、添加物または薬剤で処理してもよい。したがって、例えば、増殖因子、サイトカイン、細胞外マトリックス構成要素、および他の生物活性成分をポリマー性マトリックスに添加し、移植癒合および新規組織形成

を促進してもよい。こうした添加物は、一般的に、移植された器官または組織において適切な新規組織が形成されるのを確実にするよう、再建されまたは増大される組織または器官にしたがい、選択されるであろう（例えば、骨癒合を促進するのに使用されるこうした添加物の例には、例えばK i r k e r - H e a d, C. A. V e t. S u r g. 24 (5) : 408-19 (1995)を参照されたい）。例えば、ポリマー性マトリックス（所望により内皮細胞を植え付けられている）を用い、血管組織を増大させる場合、血管内皮増殖因子（V E G F）（例えば米国特許第5, 654, 273号参照されたい）を使用し、新規血管組織形成を促進してもよい。増殖因子および他の添加物（例えば上皮増殖因子（E G F）、ヘパリン結合上皮様増殖因子（H B G F）、繊維芽細胞増殖因子（F G F）、サイトカイン、遺伝子、タンパク質、およびそれらに匹敵するもの）を、添加細胞を使用する場合、ポリマー性マトリックス上に植え付けられている細胞により産生される可能性があるこうした増殖因子（あるとすれば）のいかなる量をも上回った量で添加してもよい。こうした添加物は、好ましくは、（例えば宿主細胞の移植片への浸潤を引き起こすまたは加速することにより）修復されそして増大されるべき組織または器官に適した種類の新規組織形成を促進するのに十分な量で提供される。他の有用な添加物には、抗生物質などの抗細菌剤が含まれる。

#### 【0025】

1つの好ましい支持マトリックスは、細胞支持マトリックスが移植されると直ちに、短い距離に渡っての栄養物の拡散により、細胞生存を可能にすることができる交差フィラメントからなる。細胞支持マトリックスは、移植に続く細胞塊の増大と協力し、血管を発達させる。

#### 【0026】

移植前に *i n v i t r o* で三次元構造構築物を形成すると、*i n v i v o* の移植後、結果として生じる最終的分化が容易になり、そしてマトリックスに対する炎症性反応の危険性を最小にし、したがって移植片攣縮および縮小を予防する。

#### 【0027】

ポリマー性マトリックスは、いかなる数の望ましい立体配置に成形し、いかなる数の総体的な系、形状または空間制限を満たしてもよい。例えば、膀胱再建のためのポリマー性マトリックスの使用において、該マトリックスを膀胱全体またはその一部の大きさおよび形状に一致するよう成形してもよい。もちろん、ポリマー性マトリックスは、異なる大きさの患者の膀胱に一致するよう、異なる大きさおよび形状に成形してもよい。所望により、ポリマー性マトリックスは、その生体分解後、生じる再建膀胱が、天然膀胱と同様の形式で、空のときしぼむことが可能であるように成形すべきである。ポリマー性マトリックスはまた、患者の特別な欲求を考慮した他の形式に成形してもよい。例えば、以前損傷を受けたまたは身体的損傷がある患者は、異なる腹腔を有する可能性があり、そして適合するよう再構築されている膀胱を必要とする可能性がある。本発明の他の態様において、ポリマー性マトリックスは、尿道、精管、ファローピウス管、涙小管などの、体内の薄層状構造の治療に使用される。こうした適用において、ポリマー性マトリックスは、中空管として成形してもよい。

#### 【0028】

ポリマー性マトリックスは、使用前、いかなる既知の方法を用い、滅菌してもよい。使用される方法は、ポリマー性マトリックスに使用されている素材に依存する。滅菌法の例には、水蒸気、乾熱、放射線、エチレンオキシドなどのガス、ガスおよび沸騰が含まれる。

#### 再建尿路上皮移植片（RUG）のための細胞採取

RUGは、部分的に、ドナーからの尿路上皮細胞および平滑筋細胞を用い、構築される。本発明の方法の1つの利点は、尿路上皮および平滑筋細胞の迅速な増殖のため、RUGを構築するのに十分な細胞を、5週間未満で増殖させることが可能であることである。自家移植RUGでは、細胞は、患者自身の組織、例えば、膀胱、尿道、尿管、および他の尿生殖組織に由来してもよい。同種異系RUGでは、細胞は、患者の種の他のメンバーに由来してもよい。異種RUGでは、細胞は、患者と異なる種に由来してもよい。ドナー細胞は、いかなる尿路上皮細胞および平滑筋細胞起源から、およびいかなる哺乳動物供給源、例えばヒト、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギおよびヒツジ供給源からであってもよい。尿路上皮細胞およ

び平滑筋細胞は、生検または剖検で単離されてもよい。さらに、細胞は凍結されまたは使用前に増大させてもよい。

【0029】

RUG構築を調製するため、尿路上皮および平滑筋細胞を含む組織を、2つの細胞懸濁物に別個に解離させる。細胞の単離および培養のための方法は、特に本明細書に援用される、発行されている米国特許第5,567,612号に論じられた。単細胞段階への細胞の解離は、単細胞懸濁物が、一定の期間、例えば1週間の*in vitro*培養の後、達成される可能性があるため、最初の初代培養では必須ではない。組織解離は、細胞を共に保持している細胞外マトリックスおよび細胞間連結を機械的および酵素的に破壊することにより、行ってもよい。すべての発達段階、例えば胎児、新生、若年から成体由来の尿路上皮細胞および平滑筋細胞を使用してもよい。

【0030】

細胞（自家移植細胞など）は、望ましいならば、*in vitro*で培養し、ポリマー性マトリックス「足場（*scaffold*）」上に植え付けるのに利用可能な細胞数を増加させてもよい。組織拒絶を防ぐため、同系異種細胞、およびより好ましくは自家移植細胞の使用が好ましい。しかし、RUG移植後、患者で免疫学的反応が起こった場合、患者を、例えばシクロスポリンまたはFK506などの免疫抑制剤で治療し、RUG拒絶の可能性を減じてもよい。特定の態様において、キメラ細胞、またはトランスジェニック動物由来の細胞を、ポリマー性マトリックス上に植え付けてもよい。

【0031】

細胞は、植付け前に、遺伝的物質でトランスフェクションしてもよい。有用な遺伝的物質は、例えば宿主における免疫反応を減じるまたは除くことが可能である遺伝子配列であってもよい。例えば、細胞表面抗原、例えばクラスIおよびクラスII組織適合抗原の発現を抑制してもよい。これにより、移植された細胞が宿主による拒絶を受ける可能性を減じることが可能になる。さらに、トランスフェクションを、遺伝子搬送にも用いることが可能である。尿路上皮および筋細胞をポリマー植付けの前に特定の遺伝子でトランスフェクションしてもよい。細胞

ーポリマー構築物は、宿主または組織設計改良器官の長期生存に必要とされる遺伝的情報を運搬してもよい。例えば、糖尿病の治療のため、インスリンを発現するよう細胞をトランスフェクションしてもよい。

【0032】

細胞培養は、細胞分画段階を伴いまたは伴わず、調製してもよい。細胞分画は、例えば当業者に知られる蛍光活性化細胞分類などの技術を用い、行ってもよい。細胞分画は、細胞の大きさ、DNA含量、細胞表面抗原、および生存度に基づき、行ってもよい。例えば、尿路上皮細胞収集のため、尿路上皮細胞を濃縮してもよく、そして平滑筋細胞および繊維芽細胞を減じてもよい。同様に、平滑筋細胞収集のため、平滑筋細胞を濃縮してもよく、そして尿路上皮細胞および繊維芽細胞を減じてもよい。細胞分画を用いてもよいが、これは本発明の実施に必須ではない。

【0033】

細胞分画は、例えば、ドナーが膀胱癌または他の腫瘍の膀胱への転移などの疾患を有する場合、望ましい可能性がある。膀胱細胞集団を分類し、正常な非癌性膀胱細胞から悪性膀胱細胞または他の腫瘍細胞を分離してもよい。1つまたはそれ以上の分類技術から単離された正常非癌性膀胱細胞を、その後、膀胱再建に用いてもよい。

【0034】

該方法における、別の所望による方法は、凍結保存である。極低温保存は、例えば、多数の侵襲外科法の必要を減じるのに有用である可能性がある。膀胱から採取した細胞を増幅してもよく、そして増幅細胞の一部を用いてもよく、そして別の一部を極低温的に保存してもよい。細胞を増幅しそして保存することが可能であれば、ドナー細胞の選択にかなりの柔軟性が可能になる。例えば、組織適合ドナーからの細胞を増幅し、そして1人以上のレシピエントに使用してもよい。

【0035】

極低温保存の有用性の別の例は、組織バンクにおいてである。ドナー細胞を組織適合性データと共に凍結保存してもよい。ドナー細胞は、例えばドナー組織バンクに貯蔵してもよい。膀胱再建に組織が必要になったとき、患者に最も組織適

合している細胞を選択してもよい。膀胱を危険にさらす可能性がある疾患を持つまたは治療を経験している患者は、その膀胱の生検試料を極低温的に保存してもよい。後に、患者自身の膀胱が衰えた場合、極低温的に保存されている膀胱細胞を融解し、治療に用いてもよい。例えば、膀胱癌が膀胱再建の後、再出現した場合、患者から培養のためさらなる組織を単離する必要なしに、極低温保存されている細胞を膀胱再建に用いてもよい。

#### 播種

細胞のポリマーマトリクス上への播種は、例えば実施例に記載するように、または標準的な方法に従って実施することができる。例えば、組織の修復に使用するためのポリマー基質上への細胞の播種が報告されている（例えばAtala, A.ら, J. Urol. 148 (2 Pt 2):658-62 (1992); Atala, A.ら, J. Urol. 150 (2 Pt 2):608-12 (1993)）。培地中で増殖した細胞をトリプシン処理して細胞を分離し、分離した細胞をポリマーマトリクス上に播種することができる。あるいは、細胞培養から得た細胞を培養プレートから細胞層として引き上げ、細胞を事前に分離することなく細胞層をポリマーマトリクス上に直接播種することができる。

#### 【0036】

好ましい実施態様では、少なくとも5000万個の細胞を媒質に懸濁し、ポリマーマトリクス表面の平方センチメートル毎に適用する。ポリマーマトリクスを標準的な培養条件下（例えば37℃、5% CO<sub>2</sub>）で、細胞が付着するまでの時間インキュベートする。しかしながら、認識されるように、高分子基質上に播種される細胞の密度は変更することができる。例えば、細胞密度が高いほど播種された細胞による組織形成が高度に促進され、密度が低いほどホストから移植片に浸透した細胞による組織の形成が相対的に高くなる。ポリマーマトリクスおよび細胞によっては他の播種法を使用してもよい。例えば、細胞を真空濾過によってポリマーマトリクスに適用してもよい。細胞の型の選択、およびポリマーマトリクス上への細胞の播種は、ここでの教示を考慮すれば通常の技術を有する当業者にはルーチンとなるであろう。

#### 【0037】

本発明の実施態様では、ポリマーマトリクスの2つの面に2つの異なる細胞集

団を播種する。これを実施するには、最初にポリマーマトリクスの片面に播種し、次いで他方の面に播種してもよい。例えば、ポリマーマトリクスを片面を上にして配置し、播種してもよい。次いで第二の面が上になるようにポリマーマトリクスを配置し直してもよい。その後、第二の面に第二の細胞集団を播種してもよい。あるいは、ポリマーマトリクスの両面に同時に播種してもよい。例えば、2つの細胞チャンバーをポリマーマトリクスの両面に配してもよい（すなわちサンドイッチ）。2つのチャンバーに異なる細胞集団を充填し、ポリマーマトリクスの両面に同時に播種してもよい。サンドイッチにしたポリマーマトリクスを回転するか、または頻繁に裏返して（flip）、両細胞集団の付着を機会を均等にしてもよい。ポリマーマトリクスの細孔が十分大きく、細胞が片面から他面に通過できる場合には、同時播種が好ましい。ポリマーマトリクスの両面に同時に播種することにより、細胞が反対側に移動する可能性が低減するだろう。

#### 【0038】

本発明の別の実施態様では、2つの独立したポリマーマトリクスに異なる細胞集団を播種してもよい。播種後、2つのマトリクスを付着させ、2つの面に2つの異なる細胞集団を有する単一のポリマーマトリクスを形成してもよい。マトリクス相互の付着は、フィブリン接着剤、液体コポリマー、縫合などのような標準的な方法を使用して行ってもよい。

#### 【0039】

##### 外科的再構築

増強すべき器官または組織へのポリマーマトリクスの移植は、実施例に記載する方法または当該分野で認識される方法に従って実施できる。実施例に示すように移植材料を標的器官に縫合することにより、ポリマーマトリクスを被験体の器官または組織へ移植することができる。

#### 【0040】

また、本発明の技術を使用して膀胱の癌を治療してもよい。例えば、正常な膀胱組織サンプルを膀胱癌に罹患した患者から切除してもよい。組織サンプル由来の尿路上皮細胞および平滑筋細胞をin vitroで一定の時間培養して増やしてもよい。細胞を蛍光活性化セルソーターを使用して選別し、癌細胞または前癌細胞を

除去してもよい。選別した細胞を使用してRUGを構築してもよい。同時に、患者の癌を治療してもよい。癌治療は、膀胱の癌部分の切除を、化学療法または放射線治療に加えて含んでもよい。癌治療の後、RUGを使用して膀胱を再構築してもよい。

#### 【0041】

膀胱の再構築の方法は実施例に開示するが、被験体の器官または組織に移植片を付加するための他の方法（例えば外科用ステープルの使用による）を使用してもよい。それらの外科的方法は、当業者が既知の方法に従って実施することができる。

#### 【0042】

これらの利益から、本発明の膀胱再構築手術の方法は多くの状況下における膀胱組織の修復に好適である。上記のように、膀胱の移植片を使用して悪化した膀胱を修復してもよい。

#### 【0043】

本発明の他の実施態様および利点は、一部は後述の説明に記載し、そして、一部はこの説明から明白となり、また本発明の実施から修得される。

#### 【0044】

##### 【実施例】

##### 実施例1 膀胱成型ポリマーの生成

繊維の平均直径が約15 $\mu$ m、繊維間の距離が約0から約200 $\mu$ m、そして約10cm $\times$ 約10cmの面積であるポリグリコール酸の合成ポリマーマトリクスを、生分解性の4-0ポリグルラクチン (polyglactin) 910縫合糸を使用して膀胱の形状をした型 (mold) に形成した。得られたフレキシブルな型 (scaffold) を液化コポリマー (約50%のポリ-DL-ラクチド-コ-グリコリドと約50%の80mg/ml 塩化メチレンの混合物) で被覆し、適切な力学的特性を得る。エチレンオキシドで殺菌した後、ポリマーをデシケーター中に保存した。

#### 【0045】

##### 実施例2 細胞の回収および培養

計14検体のビーグル犬について膀胱三角残存切除を行った。動物を無作為に



3つの群の1つに割り当てた。2検体をA群に割り当て、再構築処置を行わずに膀胱三角を縫合した。6検体をB群に割り当て、細胞を含有しない膀胱の形状をした生分解性ポリマーを用いて膀胱の再構築を行った。6検体をC群に割り当て、あらかじめ作成した組織で生成した新生器官を使用して膀胱の再構築を行った。新生器官は膀胱の形状をした生分解性ポリマーを含有するが、これは管腔表面に付着した自己由来の尿路上皮細胞および外表面に付着した平滑筋細胞を有する。細胞集団を、あらかじめ回収しておいた自己由来の膀胱経壁標本から分離して増やした。

#### 【0046】

尿路上皮細胞及び平滑筋細胞集団を1平方センチメートルの膀胱バイオブシーから分離し、慣例的に独立してエクспанションおよび継代することができた。最初の膀胱バイオブシーから最後の組織調製した新生器官のインプラントまでの平均経過時間は $32 \pm 2.8$ 日（平均+SD）であった。それぞれの細胞型（筋細胞及び尿路上皮細胞）の25cmプレート約32枚（約 $10^7$ 細胞/プレートを含有）を加工して、1個の組織調製した新生器官を構成するようにした。

#### 【0047】

回収した細胞の培養を、過去に報告されているAtalaら（J. Urol. 150:608, 1993）およびCilentoら（J. Urol. 152:655, 1994）のプロトコールに従って行ったが、それらは本明細書の一部としてここに引用する。膀胱バイオブシーの尿路上皮層および筋肉層を顕微鏡手術によって互いに剥離し、別々に加工した。すなわち、剥離した平滑筋組織を約1ミリメートルの立方体に切断し、最初に10cmの組織培養ベトリ皿に播種した。平滑筋培地の継代及びエクспанションはダルベッコのModified Eagles培地（DMEM, Sigma, St. Louis, MO）に10%ウシ胎児血清（Biowhittaker社, Walkersville, MD）を補足したものをを用いて行った。尿路上皮細胞も1ミリメートルの立方体に切断し、24穴プレートに配した。尿路上皮培地の継代及びエクспанションは血清を含有しないケラチノサイト増殖培地に約5ng/mlの上皮成長因子および約50μg/mlのウシ脳下垂体抽出物（Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY）を補足したものをを用いて行った。全ての細胞培地は37℃で加湿雰囲気中、約5%の二酸化炭素に保

持してインキュベートした。培地は週に2回交換した。細胞の継代には、約80%の集密度の培地のトリプシン処理を、1ミリモルのエチレンジアミン四酢酸に混合した0.05%トリプシン中で5分間インキュベートして行った。この過程の後、ダイズトリプシン阻害剤(2ユニット/トリプシン1ユニット)を細胞懸濁液に添加した。尿路上皮細胞および平滑筋細胞の両方を、1平方センチメートルのポリマー表面当たり約100万細胞の播種密度にするのに十分な量の細胞が得られるまで別々にエクスパンジョンした。

#### 【0048】

##### 実施例3 ポリマー芯材(scaffold)への細胞の播種

それぞれの組織調製した新生器官に対して、それぞれの型の細胞(筋肉および尿路上皮)の約32の集密した25cmプレートで播種用に加工した。筋細胞培地をトリプシン処理し、回収し、洗浄して1つのチューブに合一した。あらかじめ型どった膀胱の形状をしたポリマーマトリクスの外表面に再懸濁した平滑筋細胞集団を播種した。細胞を播種したポリマーを、10%ウシ胎児血清(Biowhitaker社, Walkersville, MD)を補足したダルベッコのModified Eagles培地(DMEM, Sigma, St. Louis, MO)中でインキュベートした。培地を12時間間隔で交換し、確実に栄養が十分供給されるようにした。48時間のインキュベーションの後、尿路上皮細胞を同様に加工し、ポリマーの管腔表面に播種した。

#### 【0049】

##### 実施例4 膀胱の再構築

体重1キログラムに対して0.1mgのアセプロマジン筋肉内注射して前処理した後、体重1キログラム当たり約25から約35mgの静脈内ペントバルビタール麻酔下で気管内通気しながら手術を行った。約500mgのセファゾリンナトリウムを術前および術中に静脈内投与した。更なる処置としてセファゾリンナトリウムの皮下投与を術後5日間、約30ミリグラム/キログラム体重/日の量で実施した。術後の鎮痛処置は体重1キログラム当たり約0.1から約0.6ミリグラムのブトルファノールを皮下注射して管理した。

#### 【0050】

図1Aに示すように、中線開腹術を実施し、膀胱を露出し(図1A)、両方の

尿管を確認した。膀胱壁を腹側で切開して両方の尿管接合部を露出させ、4 Fのステントを一時的に挿管した。部分的な膀胱切除を行い、尿道と尿管の接合部を有する三角部分は残存させた。尿管を損傷または遮断しないよう留意した。2検体の動物では膀胱三角を、ポリマー移植片無しで2層の4-0 vicrylで閉じた。図1 Bに示すように、12検体の動物について、膀胱型のポリマーマトリクスと膀胱三角間を4-0 vicrylのinterlocking running縫合で吻合した。12検体の動物中、6検体には膀胱型ポリマーのみ、6検体には細胞で被覆した膀胱型ポリマーを施与した。10 Fのシリコンカテーテルを膀胱三角から尿道に逆行で挿入した。三角部の短い粘膜下トンネルを通して膀胱管腔に8 Fの恥骨上カテーテルを挿入した。恥骨上カテーテルを4-0 chromicのpursestring縫合で膀胱漿膜に縫合した。将来的に移植部位を識別するために、膀胱三角と移植片間の吻合には四分円ごとにパーマネント・ポリプロピレン縫合糸でマーキングした。新生膀胱をフィブリン接着剤 (Vitex Technologies社, New York, NY) で被覆した。図1 Cに示すように、新生レザバーの周囲に網 (omentum) をかけて固定した。腹部を3層の3-0 vicrylで閉じた。麻酔から覚醒した後、術後の初期の間、全ての動物に抑制襟 (restraint collar) を着用させて創傷およびカテーテル処置に接触しないようにした。経尿道カテーテルを術後4日目および7日目の間に除去した。膀胱造影を術後約4週間、恥骨上カテーテルを除去する直前まで実施した。膀胱造影および尿力学試験を術後約1カ月、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約6カ月、および約11カ月の時点で連続的に実施した。

#### 【0051】

##### 実施例5 再構築した膀胱の分析

尿力学試験および放射線膀胱造影を術前および術後に (術後約1カ月、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約6カ月、および約11カ月の時点で) 実施した。再構築処置を行わずに膀胱三角を閉じた2検体の動物は約11カ月の時点で処分した。残りの2つの実験群の動物は術後約1カ月、約2カ月、約3カ月、約4カ月、約6カ月、および約11カ月の時点で処分した。膀胱は回収して肉眼検査、組織学検査、および免疫細胞化学検査を行った。

#### 【0052】

尿力学試験の実施には7Fの二重管腔経尿道カテーテルを使用した。膀胱を空にし、膀胱内圧を記録しながらあらかじめ加温した生理食塩水を一定速度で点滴注入した。記録は漏出閾値圧 (leak point pressure; LPP) に達するまで継続した。膀胱の最大容量 ( $V_{ol_{max}}$ )、LPP、および膀胱コンプライアンス ( $V_{ol_{max}}/LPP$ ) を記録した。膀胱のコンプライアンスは膀胱エラストラスとも呼ばれるが、圧力または外力に対する破損することのないたわみの質を示す。また膀胱コンプライアンスは、圧力または外力に対して破損することなくたわむ能力の尺度を表すものでもあり、膀胱の膨張性を表す。これは通常、単位圧力変化当たりの容量変化の単位で測定される。その後、放射線膀胱造影を実施した。膀胱を空にし、造影剤を蛍光透視しながら膀胱内に点滴注入した。

#### 尿力学の結果

三角残存膀胱切除の前に、A、B、およびC群の動物は術前の平均膀胱容量 ( $78 \pm 16\text{ml}$ ,  $63 \pm 22\text{ml}$ ,  $69 \pm 8\text{ml}$ ,  $p=0.44$  [平均  $\pm$  A SD]) または術前の膀胱コンプライアンス ( $2.6 \pm 0.2\text{ml/cm H}_2\text{O}$ ,  $2.2 \pm 1.2\text{ml/cm H}_2\text{O}$ ,  $2.1 \pm 1.1\text{ml/cm H}_2\text{O}$ ,  $p=0.85$  [平均  $\pm$  SD]) について有意な差はなかった。

#### 【0053】

コントロール動物はいずれも部分的膀胱切除後に再構築を実施しなかったが、観察期間中、本来の容量の22% ( $\pm 2\%$ ) しか保持できなかった。頻繁な排尿のパターンがこれらの動物で明白であった。細胞を含有しないポリマーを用いて再構築した動物では平均膀胱容量が術前の値の46% ( $\pm 20\%$ ) であった。組織調製した膀胱での置換では、平均膀胱容量は元来の膀胱切除前の容量の95% ( $\pm 9\%$ ) となった (図2A)。

#### 【0054】

部分的に切除した膀胱で、再構築しなかったものは膀胱コンプライアンスの明らかな低下を示し、平均値は術前の値の10% ( $\pm 3\%$ ) であった。また、細胞を含有しないポリマーのみのインプラントの全てでもコンプライアンスがかなり低下した。種々の時点での処分時で、膀胱のコンプライアンスは平均で術前の値の42% ( $\pm 21\%$ ) に低下した。組織調製した膀胱のコンプライアンスは、本来の

膀胱が存在していた時に測定した術前の値とほとんど差異が無かった (106%  $\pm$  16%、図2B)。

#### 【0055】

臨床的には、全ての動物は膀胱の再構築後、安定した経過をたどり、カテーテルの除去と同時に自発的に排尿ができ、意図された試験期間の間生存した。手術の1カ月後、放射線膀胱造影は、全ての動物で漏出しないレザバーであることを示した。部分的膀胱切除のみを行った動物の膀胱造影は、増強していない膀胱三角が試験期間中、最低限のレザバー容量しか再生できないことを示した。ポリマーのみの移植では、移植片の部分的崩壊の徴候が見られた。組織調製した膀胱は完全に膨張可能であり、その輪郭は元来の膀胱三角と識別することができた。経過観察のための膀胱造影の間、ポリマーのみのインプラントではより小さいレザバーであることを示し続け、他方組織調製した膀胱はサイズおよび形状が正常と考えられた (図3)。

#### 【0056】

##### 実施例6 肉眼所見

意図した時点でペントバルビタールの静脈内投与によって動物を安楽死させた。内部器官および尿生殖路を肉眼での異常について検査した。膀胱を回収し、本来の膀胱三角と移植片の境界部分を示すマーキング縫合線を露出させた。本来の膀胱三角内で輪郭を取った境界部分および近い方に位置する新生膀胱の横断面で切開した。

#### 【0057】

三角残存膀胱切除のみ (A群) : レザバーは小さかったが、正常な外観であった (図4AおよびB)。

#### 【0058】

ポリマーのみの膀胱 (B群) : 細胞を含有しないポリマーインプラントを1カ月で回収し、肉眼で検査したところ、ポリマーの本来の球状構造が部分的に崩壊していた。唯一、無症候性の膀胱結石 (11mm) が2カ月の時点で観察され、この試験で唯一の結石形成の発生を示していた。2カ月の時点での剖検で、移植片の約50%の縮小が肉眼で明らかであった。膀胱を4、6、および11カ月の時

点で回収したところ、厚い癒痕組織の進行性の生成を弓隆部に含有し、粘着性の網で固く被覆されていた（図4CおよびD）。11カ月までに、90%を越える移植片の縮小が肉眼で明白であった。最初に配したポリプロピレンのマーキング縫合線は膀胱三角部分に、癒痕組織に隣接して認められた。膀胱部分全体の約10%はマーキング縫合線の上部にあった。

#### 【0059】

組織調製した新生器官（C群）：剖検では上部尿路の閉塞、結石形成、痂皮形成、または他の異常の徴候は全ての検査時点で認められなかった。1カ月の時点で、網で被覆された組織調製した新生膀胱内のポリマー芯材は目に見えて明白に確認できた。新生膀胱はフレキシブルで膨張性のある形状を有した。6および11カ月の時点で、網の付着物を膀胱弓隆部から無遠慮に（bluntly）分離することができたが、漿膜様の層が組織調製した新生器官上に再生されていた（図4E）最初に配したポリプロピレンのマーキング縫合線は膀胱の末端領域の、膀胱三角のレベルに認められた。総膀胱部分の約70%がマーキング縫合線の上部にあった。腹部に膀胱を挿入する際、平滑な粘膜表面が認められたが、本来の膀胱と組織調製した膀胱の間に差異はなかった（図4F）。

#### 【0060】

試験期間中、いずれのイヌも30の有害反応を示さなかった。全ての動物が処分する時点まで生存し、顕著な合併症（例えば尿路感染または結石形成）は見られなかった。全ての増強した膀胱の造影は、処置後1、2、および3カ月の時点で漏出せず、正常な膀胱の形状であることを示した。

#### 【0061】

回収の際、増強した膀胱は肉眼で正常であり、移植した領域に憩室形成の痕跡は見られなかった。移植部分の厚さは本来の膀胱組織のものと同様であった。癒着または繊維化の形跡はなかった。組織学的には、回収した膀胱は全て、粘膜下組織および平滑筋に包囲された、尿路上皮細胞に覆われた管腔からなる正常な細胞構成を含有した。脈管形成反応が全ての標本で見られた。

#### 【0062】

実施例7 組織学のおよび免疫細胞化学的所見

標本を10%ホルマリン緩衝液で固定し、加工した。組織切片を約4から約6ミクロンで切断し、ヘマトキシリンおよびエオジン (H & E)、およびマッソンの3色染色で慣例的に染色した。免疫細胞化学的染色法をいくつかの特異的な一次抗体を用いて実施し、回収した膀胱において尿路上皮細胞および平滑筋細胞の分化をキャラクタライズした。抗デスミン抗体 (モノクローナルNCL-DES-DE11、クローンDE-R-11, Novocastra (登録商標), Newcastle, UK) (中間径フィラメント筋細胞タンパク質デスミンの部分と反応する)、および抗アルファ平滑筋アクチン抗体 (モノクローナルNCL-SMA, クローンasm-1, Novocastra (登録商標), Newcastle, UK) (膀胱平滑筋アクチンを標識する) を平滑筋の分化の一般的なマーカーとして使用した。抗パンサイトケラチン (pancytokeratin) AE1/AE3抗体 (モノクローナル, カタログ番号1124 161, Boehringer Mannheim (登録商標)) および抗サイトケラチン7抗体 (NCL-CK7, クローン LP5K, IgG2b, Novocastra (登録商標), New Castle, UK) (上皮組織における細胞骨格複合体の部分形成する中間径フィラメントに対して反応する) を、尿路上皮を同定するために使用した。ポリクローナル抗体を用いた抗非対称単位膜 (AUM) 染色を使用して哺乳類のuroplakinの存在を確認したが、これは哺乳類の尿路上皮に頂上プラーク (apical plaque) を形成し、尿路上皮細胞分化の末期に重要な機能を果たすものである。抗S-100抗体 (Sigma (登録商標), St. Lois MO, No. IMM-9) (酸性カルシウム結合タンパク質S-100と反応し、主に神経系におけるシュヴァン細胞およびグリア要素に存在する) を使用して神経組織を同定した。

#### 【 0 0 6 3 】

標本をカルノア液で固定し、免疫染色のために慣例的に加工した。約0.1%トリプシンを用いた高温での抗原非マスキング前処理を、市販のキットを使用して販売者の推奨する方法に従って実施した (Sigma (登録商標), St. Lois MO, T-8 128)。抗原特異的な一次抗体を、脱パラフィンして水和した組織切片に適用した。ネガティブコントロールは一次抗体のかわりに単なる血清で処理した。ポジティブコントロールは正常な膀胱組織からなるものであった。リン酸緩衝液で洗浄した後、組織切片をビオチン化した二次抗体と共にインキュベートし、再び洗浄した。ペルオキシダーゼ試薬を添加し、基質を添加すると、抗体の沈着部位が

褐色沈着物として可視化された。後染色をギルのヘマトキシリンを用いて実施した。

【0064】

三角残存膀胱切除のみ（A群）：三角残存膀胱切除した器官は正常な組織学的構造を示すことが免疫細胞化学的染色で確認された。

【0065】

ポリマーのみの膀胱（B群）：細胞を含有しないでインプラントしたポリマーでは、線維芽細胞の沈着および炎症細胞（マクロファージを含む）の広範なリクルートメントからなるfibrovascular反応、そして脈管新生の広範な徴候が1カ月の時点で見られることが明らかとなった。上皮の被覆がポリマー全体に顕著であった。上皮は、抗パンサイトケラチンAE1/AE3、抗サイトケラチン7、および尿路上皮特異的抗AUMと広範に反応してポジティブに染色された。繊維性の組織沈着がポリマーの分解部位で認められた。2、3、および4カ月の時点で、本来の膀胱三角の粘膜下層および筋肉層が境界部分の線維性ポリマー領域へ拡大した。6および11カ月の標本では、多量の結合組織が生成され、近くに位置する新生膀胱領域の完全に分解したポリマー繊維と置き換わっていた。平滑筋アルファアクチンにポジティブな細胞はこの領域ではわずかな形跡のみであった。

【0066】

組織調製した新生器官（C群）：1カ月の時点で回収した組織調製した新生器官は管腔が尿路上皮で完全に被覆されていた。尿路上皮は、抗パンサイトケラチンAE1/AE3、抗サイトケラチン7、および尿路上皮特異的抗AUMと広範に反応してポジティブに染色された。ポリマー繊維により細胞が生成され、 $\alpha$ 平滑筋アクチンに対してポジティブに染色された。十分な脈管形成反応が明らかであった。2カ月の時点で、ポリマーが完全に生分解される前に、筋線維は空間的アライメントを有し、不定サイズの束状構造を形成した。3カ月までにポリマーは完全に分解し、三層構造が近くに位置する新生膀胱部分に認められ、これは粘膜下組織の被覆上にある形態学的に正常な尿路上皮内層、それに次ぐ多形の平滑筋束を含有する層からなる。術後6カ月で、神経組織の内殖が初めて存在することがS-100染色で明らかとなった。膀胱は正常な組織学的および表現型構造にまで成熟した



ことが、ヘマトキシリンおよびエオジン、3色染色、アルファ平滑筋アクチン、デスミン、パンサイトケラチンAE1/AE3、サイトケラチン7、およびAUM抗体での染色によって明らかとなった(図5および6)。組織学的および免疫細胞化学的に、6カ月および11カ月の時点での膀胱間に顕著な差異はなかった。

#### 【0067】

##### 実施例8 統計的所見

統計的評価を測定値について行ったが、これにはtwo-tailed student's t-テストを用い、0.05以下のp-値を有意であるとみなした。膀胱切除のみのコントロールおよびポリマーのみの移植片の平均容量は、それぞれ術前の値の22%および46%を保持した。組織調製した膀胱での置換では、平均膀胱容量は本来の膀胱切除前の容量の95%であった。部分的膀胱切除したレザバーで、再構築しなかった膀胱およびポリマーのみで再構築した膀胱は、膀胱コンプライアンスの顕著な低下を示した(10%および42%)。組織調製した膀胱のコンプライアンスは、本来の膀胱が存在している時に測定した術前の値とほとんど差異を示さなかった(106%)。組織学的には、ポリマーのみの膀胱は、厚い線維性の粘膜下層および筋線維の薄層を有する正常な尿路上皮細胞のパターンを示した。回収した組織調製した膀胱は正常な細胞構成を示し、尿路上皮、粘膜下組織、および筋肉の三層からなるものであった。免疫細胞化学分析をデスミン、 $\alpha$ -アクチン、サイトケラチン7、パンサイトケラチンAE1/AE3、およびuroplakin IIIについて行い、筋肉および尿路上皮の表現型を確認した。S-100染色は神経構造の存在を示した。

#### 【0068】

三角残存膀胱切除を行い、一次的創閉鎖をした動物は、一定期間にわたってわずかにレザバー容量を獲得したが、膀胱切除前の値には近似しなかった。遊離移植ポリマーのみの膀胱では容量がわずかに増加し、繊維性の新生膀胱が発達し、これは十分発達した尿路上皮層を有するが筋肉構造は明らかに欠如しており、コンプライアンス曲線の低下を伴っていた。組織アネロイド新生膀胱は切除前の膀胱容量に近似し、それを上回った。これらの膀胱のコンプライアンスはそれぞれの時点(4週間の術後検査を含む)で膀胱切除前の値に近似した。回収した組織調製した膀胱は正常な細胞構成を示し、尿路上皮、粘膜下組織、および筋肉の三

層からなるものであった。免疫細胞化学分析をデスミンおよび平滑筋アルファアクチンで行い、筋肉の表現型を確認した。パンサイトケラチンAE1/AE3、サイトケラチン7、およびuroplakin IIIは免疫組織化学によって明示することができ、尿路上皮の表現型を確認した。ポジティブなS-100染色は、神経構造の組織調製した膀胱への内殖が可能であることを示唆した。組織調製した膀胱はインプラントの直後に正常に機能できた。構造的および機能的に、それらは天然の膀胱と区別がつかなかった。われわれの結果は、三層構造（in vitroで膀胱筋および尿路上皮からなる）の生成は、新規に生成した膀胱組織の最終的な機能性に有益であることを初めて示すものである。われわれの、細胞を含有しないポリマー移植片での膀胱置換の結果は、ここ数十年にわたって遊離移植に関して文献で既に報告されているものと一致する。他の物質を細胞を含有しない遊離移植片として使用する場合、異なる組織学的成分が存在しうるが、必ずしも完全に発達し、または機能的である必要はない。さらにまた、細胞を含有しないポリマーによる膀胱のコントロール群の結果は、一定期間にわたる移植片の拘縮および縮小に関して、文献と一致する。第二のコントロール群は膀胱切除後、一次的創閉鎖を行ったが、これが明らかに示すところによれば、組織調製した新生膀胱における容量の増加は主にインプラントによるものであり、自然な再生および本来のイヌの膀胱の弾性によるものではない。結果が示すところによれば、尿路上皮および筋細胞を播種した膀胱粘膜下組織は新しい膀胱組織を生成することができ、これは組織学的および機能的に天然の膀胱と差異がない。この結果は、播種した細胞によって再生された細胞外マトリクスによって膀胱の構造形態を保持できることによるものでありうる。ポリマーマトリクス上に播種した尿路上皮細胞および筋細胞は移植片の再吸収（resorption）を防止すると考えられる。この技術により、正常な膀胱の組織と解剖学的および機能的に類似した新しい膀胱組織を生成することができる。

#### 【 0 0 6 9 】

本発明の他の実施態様および使用は、本明細書を考慮し、またここに開示する本発明を実施することにより、当業者に明らかとなるであろう。いかなる理由でもここで言及する全ての米国特許および他の参考文献は明白に本明細書の一部と

してここに引用する。本明細書および実施例は単なる例証であるとみなされるべきであり、本発明の厳密な範囲および意図は上記の請求の範囲に示されるものである。

【図面の簡単な説明】

本特許ファイルは、カラー制作されている少なくとも1つの図を含む。カラー図を含む本特許のコピーは、要請および必要な料金の支払いに際し、特許および登録商標庁により提供されるであろう。

【図1】 図1は、(A) 三角温存膀胱切除術 (trigone-sparing cystectomy) 前の天然イヌ膀胱；(B) 該三角に吻合されている設計改良器官；および (C) 経尿道および骨盤上カテーテルにより減圧され、網 (omentum) に包まれている移植物を表す。

【図2】 図2は、(A) 膀胱容量および (B) 手術前容量100%に比較した異なる手術後の時点での従順さを表す。

【図3】 図3は、ほぼ全面的な膀胱切除の後、(A) 再建なしにほぼ全面的な膀胱切除 (A群)；(B) ポリマーのみ移植 (B群)；および (C) 組織設計改良器官移植 (C群) を行った11か月後のX線膀胱造影図を表す。

【図4】 図4は、11か月後に回収した (AおよびB) ほぼ全面的な膀胱切除コントロール；(CおよびD) ポリマーのみ移植；および (EおよびF) 組織設計改良器官の全体的な外観を表す。

【図5】 図5は、(A) 正常イヌ膀胱；(B) 細胞不含ポリマー再建膀胱の膀胱ドーム (B群)；(C) 組織設計改良器官 (C群) の手術6か月後のH&E組織学的結果を表す。

【図6】 図6は、(A) パンサイトケラチンAE1/AE3；(B) 尿路上皮分化関連膜タンパク質；(C) 平滑筋アクチン；および (D) S-100抗体に関する、移植6か月後の組織設計改良器官の陽性免疫細胞化学的染色を表す。

【図 1 A】

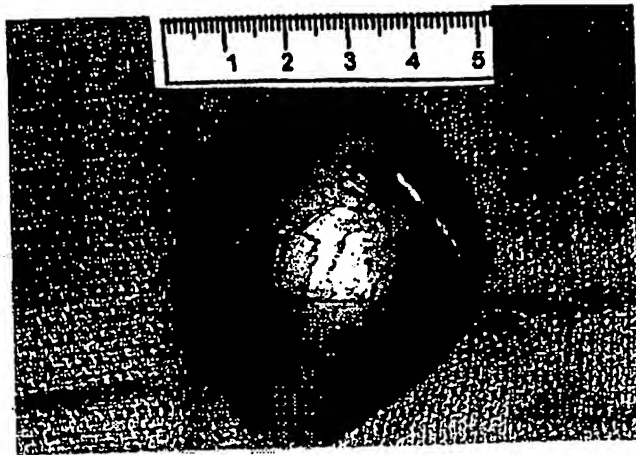


FIG. 1A

【図 1 B】



FIG. 1B

【図 1 C】

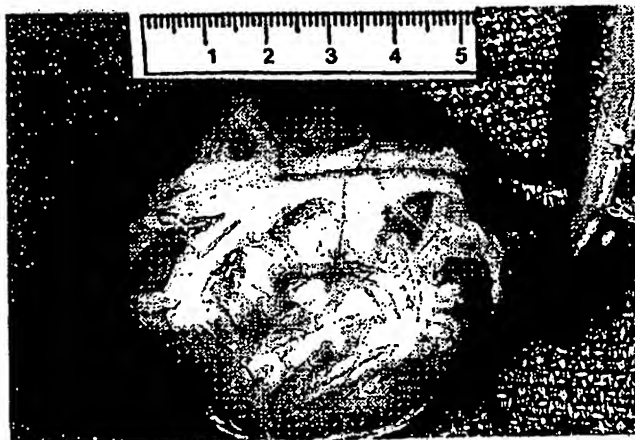


FIG. 1C

【図 2】

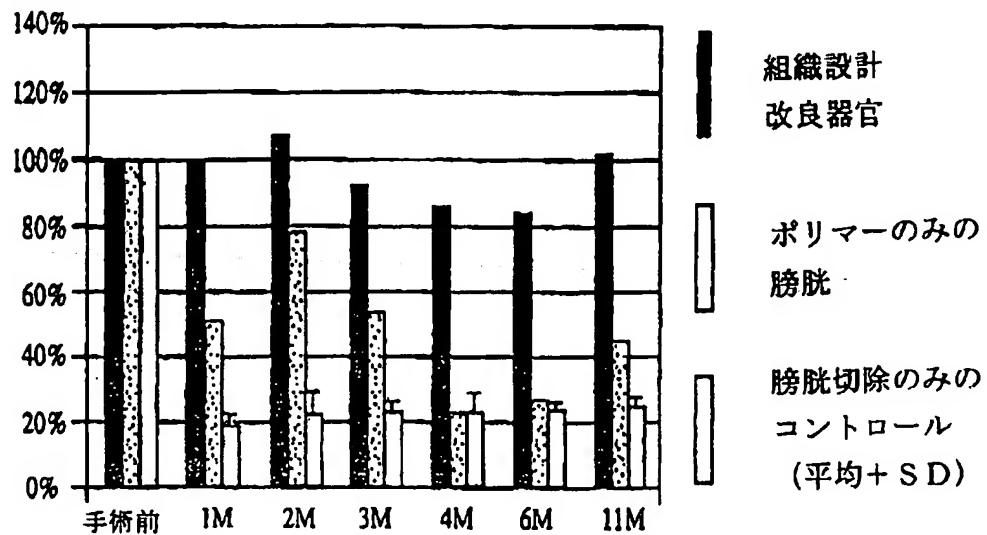


図 2 A

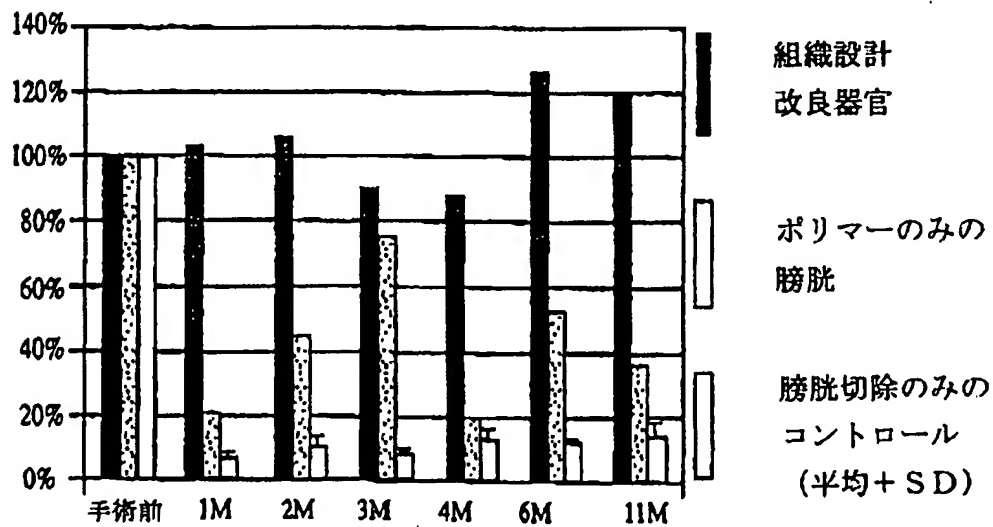


図 2 B

【図 3 A】

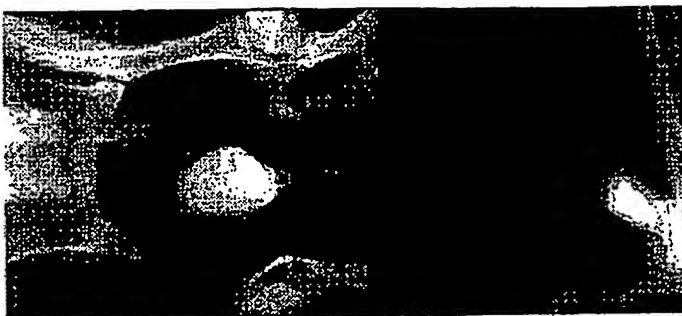


FIG. 3A

【図 3 B】



FIG. 3B

【図 3 C】



FIG. 3C

【図 4 A】



FIG. 4A

【図 4 B】



FIG. 4B

【図 4 C】

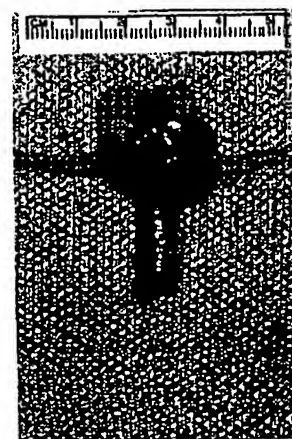


FIG. 4C

【図4D】



FIG. 4D

【図4E】



FIG. 4E

【図4F】



FIG. 4F



【図 5 A】

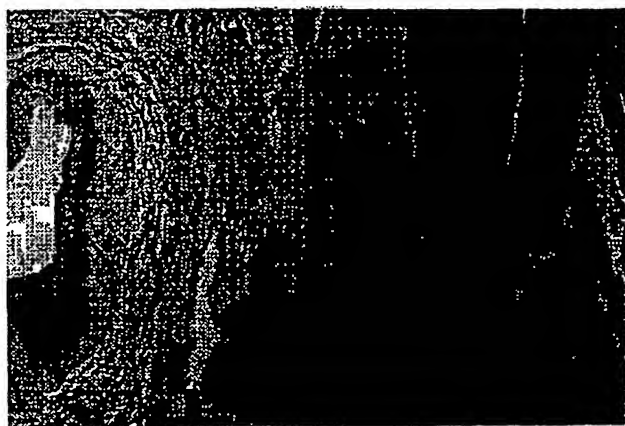


FIG. 5A

【図 5 B】

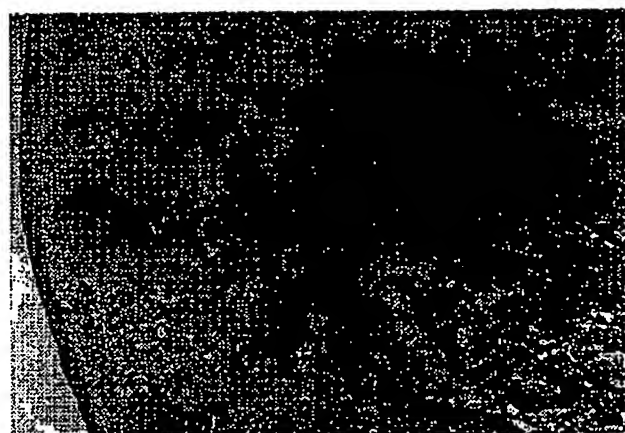


FIG. 5B

【図 5 C】

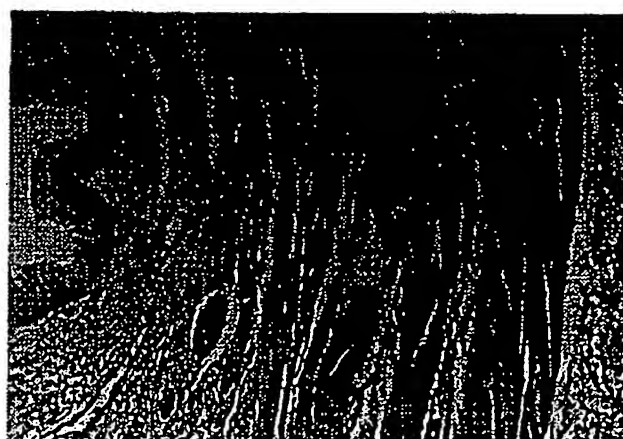


FIG. 5C

【図 6 A】



FIG. 6A

【図 6 B】



FIG. 6B

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

### **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**